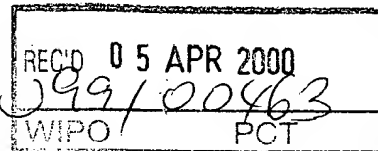




09/890353

PCT

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ  
(РОСПАТЕНТ)**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

рег. No 20/12-165

"13" марта 2000 г.

RU 99/00463

**СПРАВКА**

EJU

Федеральный институт промышленной собственности Российского агентства по патентам и товарным знакам настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы и чертежей (если имеются) заявки на выдачу патента на изобретение № 99124800, поданной в ноябре месяце 30 дня 1999 года ( 30.11.99 ).

**Название изобретения**

Инсулинсодержащее лекарственное средство для перорального применения и способ его получения

**Заявитель**

МОРЕНКОВА Светлана Александровна

**Действительный автор(ы)**

МОРЕНКОВА Светлана Александровна

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)Уполномоченный заверить копию  
заявки на изобретениеГ.Ф. Востриков  
Заведующий отделом

## ИНСУЛИНСОДЕРЖАЩЕЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

Изобретение относится к области медицины и касается инсулинсодержащего лекарственного средства для перорального применения и способа его получения.

Сахарный диабет — одно из наиболее распространенных тяжелых заболеваний, в основе которого лежит абсолютный или относительный недостаток гормона поджелудочной железы — инсулина.

Инсулин является полипептидным гормоном с молекулярной массой 6000. Он оказывает влияние на все виды обмена веществ в организме: повышает проникновение глюкозы в ткани организма, способствует ее утилизации, снижает содержание гликогена в печени и повышает его количество в мышцах, повышает интенсивность синтеза белка и замедляет распад последнего.

Основным способом введения инсулина в организм человека является подкожные или внутримышечные инъекции препарата. Попытки введения инсулина наиболее физиологическим и удобным для больных пероральным путем оказались безуспешными, поскольку инсулин легко деградирует под действием пищеварительных ферментов, что приводит к потере его биологической активности.

Главным препятствием, возникающим на пути создания пероральных форм инсулина является его низкая устойчивость к действиям протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта.

За последние десятилетия были предприняты многочисленные попытки создания пероральных форм инсулина, однако до сих пор не удалось создать эффективно действующий препарат, способный конкурировать по своей активности с инсулином, вводимым инъекционным путем.

Известен препарат инсулина для перорального введения, представляющий собой водно — масляную микроэмульсию, состоящую из инсулина, липидов и протеазного ингибитора. Микроэмульсия покрывается затем карбоксиметилцеллюлозой (1).

Существенным недостатком этого препарата, наряду с трудоемкой и дорогостоящей технологией изготовления, является носитель — карбоксиметилцеллюлоза, которая подвержена воздействию микроорганизмов, а также способна сорбировать большое количество инсулина, в результате чего полученная форма не удовлетворяет требованиям эффективного перорального препарата инсулина.

Известно твердое инсулинсодержащее лекарственное средство, состоящее из ядра, содержащего инсулин и вспомогательные вещества, и оболочки из биodeградируемого пленкообразующего полимерного материала (2).

Средство изготавливают введением в твердую желатиновую капсулу или таблетку 1-40 мг кристаллического инсулина и 200 мг стехиометрической смеси 5-метоксисалициловой кислоты и бикарбоната натрия. Затем капсулу (таблетку) покрывают сополимером гидроксиэтилметакрилата и стирола, сшитым дивинилазобензолом. Оболочка устойчива к действию среды желудка и тонкого кишечника, но распадается в толстом кишечнике под действием присутствующих там микроорганизмов.

Недостатком этого средства является низкая эффективность и неопределенное время достижения максимального эффекта. Пероральное введение крысам указанного средства, содержащего 1 ед. инсулина, приводит к уменьшению концентрации глюкозы в крови на 20% через 9 часов после введения. В то же время подкожное введение раствора инсулина в дозе 0,1 или 1,0 ед. приводит к снижению уровня глюкозы в крови на 39 и 63 % соответственно. Максимальный гипогликемический эффект для отдельных животных достигается в период от 1 до 9 часов, а у некоторых животных эффект уменьшения концентрации глюкозы отсутствует и через 10 часов после введения лекарственного средства.

Известно твердое инсулинсодержащее лекарственное средство, состоящее из ядра, содержащего инсулин, ингибитор протеолитических ферментов и вспомогательные вещества, и желудочно — резистентной оболочки (3 и 4).

В качестве ингибитора протеолитических ферментов лекарственное средство содержит ингибитор трипсина из сои, а в качестве вспомогательных веществ — холат натрия и лактозу. Лактозу используют в качестве неактивного на-

полнителя, а холат натрия – в качестве соединения, повышающего проницаемость инсулина через стенки кишечника.

Недостатком этого средства является низкая эффективность. Так, при пероральном введении средства здоровым собакам при дозе инсулина 40 ед./кг веса животного максимальное снижение концентрации глюкозы в крови животного составляет 18%, в то время как с помощью подкожной инъекции аналогичного гипогликемического эффекта можно достичь при дозе инсулина в 10 раз меньшей. Кроме того, указанное средство, содержащее ингибитор трипсина из сои, обладает избирательным действием по отношению к различным видам животных, иными словами не является универсальным. Так, при пероральном применении оно проявляет активность по отношению к собакам и не активно по отношению к крысам (4).

Известно инсулинсодержащее лекарственное средство, предназначенное для лечения больных сахарным диабетом пероральным путем, состоящее из ядра, содержащего инсулин, белковый ингибитор протеолитических ферментов, представляющий собой сшитый гидрофильный полимер, модифицированный овомукоидом, и вспомогательных веществ и желудочно – резистентной оболочки (5).

Средство содержит 10 ЕД инсулина на 1 таблетку. Средство обеспечивает статически достоверный гипогликемический эффект на различных моделях млекопитающих, включая человека, т.е. носит универсальный характер. Причем дозы, требуемые для достижения необходимого терапевтического действия, являются сравнимыми с уровнями для инъекционного инсулина. Однако средство обладает невысокой устойчивостью, срок эксперимента до 50 суток, а также сравнительно невысокой удельной активностью 20 ЕА на 1 г. сухой таблетки.

Известен способ получения инсулинсодержащих полимерных гидрогелей, включающий иммобилизацию инсулина в объеме сшитого полимера, модифицированного ингибитором протеолитических ферментов - овомукоидом (6).

Способ позволяет получить средство, обладающее активностью, составляющей 60 - 70% активности препарата инсулина при подкожном введении. Однако содержание инсулина в 1г. гидрогеля является невысоким.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является способ получения препарата для перорального применения, включающий инкубацию инсулина с эритроцитами в соотношении 1 — 4 :100 в присутствии сшивающего агента в конечной концентрации 0,15 - 0,25% (7).

В результате получен препарат с содержанием 1000 Е/1г сухой массы со сроком хранения в лиофилизированном виде до нескольких лет.

Задача предлагаемого изобретения состоит в создании инсулинсодержащего средства для перорального применения, т.е. устойчивого к действию протеолитических ферментов в желудочно-кишечном тракте с повышенным содержанием инсулина в 1 г сухого вещества, что расширяет возможность применения средства в различных лекарственных формах.

Сущность изобретения состоит в том, что инсулинсодержащее средство для перорального применения представляет собой инсулин, иммобилизованный на эритроцитах свежей крови млекопитающих в присутствии сшивающего агента, при соотношении, в масс %: инсулин : эритроциты свежей крови млекопитающих 5 — 10 :100 и вспомогательное вещество с содержанием инсулина в лиофилизированной форме 1250 — 2000 Е инсулина на 1г. сухой массы.

Указанное средство в качестве вспомогательного вещества может содержать желатин в количестве от 1 до 2,5%

Указанное средство включает в качестве эритроцитов при иммобилизации инсулина эритроциты, выделенные из свежей крови свиньи, или лошади, или человека.

Указанное средство в качестве сшивающего агента может содержать глutarовый диальдегид.

Способ получения инсулинсодержащего лекарственного средства для перорального применения включает выделение эритроцитов из свежей крови млекопитающих, их инкубацию с инсулином при соотношении, масс %: инсулин : эритроциты из свежей крови млекопитающих 5 — 10 : 100 при конечном содержании сшивающего агента 0,05 — 0,35% в течение 4 — 6 часов при 4 — 8°C, при этом в процессе выделения эритроцитов на кровь воздействуют центробежными силами величиной 350 — 1100\*g в течение 15 — 30 минут, а при инкубации инсулина с эритроцитами производят маятниковое качание смеси с частотой 0.1 —

4 часа. Соотношение инсулин : эритроциты 10 :100. Перед лиофилизацией добавляли желатин до конечной концентрации 1%.

Получили готовый продукт с содержанием инсулина 2000 Е на 1 г сухо-го продукта. Перед употреблением препарат эмульгировали в воде до необходимой концентрации.

Пример 3: Испытание инсулинсодержащего лекарственного средства проводили на крысах с экспериментальным диабетом, вызванным стрептозотоцином. Крысам-самцам вводили внутривентриально стрептозотоксин из расчета 120мг/Кг массы животного. Стрептозотоксин растворяли в цитратном буфере pH 4,5 непосредственно перед введением. Через 48 часов животным через зонд вводили инсулинсодержащего лекарственного средства, иммобилизованного с помощью глутарового диальдигида из расчета 15 – 20 ед. инсулина в препарате (на одно животное), приготовленном по примеру 1, и через 3 часа у животных определяли в крови содержание глюкозы. Контролем служили животные с стрептозотоксиновым диабетом, не получавшие инсулинсодержащего лекарственного средства.

Как видно из данных таблицы 1, у животных с стрептозотоксиновым диабетом через 3 часа после введения инсулинсодержащего лекарственного средства уровень глюкозы в крови снижался в среднем на 65% по сравнению с диабетическими животными, не получавшими инсулинсодержащего лекарственного средства.

Пример 4: инсулинсодержащее лекарственное средство, полученное по примеру 1, вводили взрослым мышам – самцам массой 20 грамм через зонд в объеме 0,2 мл. Животные получали 2,0-2,5 ед. инсулина в инсулинсодержащем лекарственном средстве. Содержание глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом. Результаты приведены в таблице 2.

Из приведенных данных видно, что инсулинсодержащее лекарственное средство при введении мышам снижает уровень глюкозы в крови в среднем на 55% по сравнению с животными не получавшими инсулинсодержащее лекарственное средство.

Пример 5: Крысам-самцам массой 150-180 г. вводили через зонд в пищевод инсулинсодержащее лекарственное средство, полученное по примеру 2 из

расчета 10-15 ед. И через 3 – 6 часов определяли уровень глюкозы. Контролем служили крысы не получавшие инсулинсодержащего лекарственного средства. Данные приведены в таблице № 3.

Как видно из данных таблицы 3 у крыс, получавших инсулинсодержащее лекарственное средство через 3 и 6 часов происходит значительное снижение уровня глюкозы в крови, составляющее 52% и 53% соответственно к исходному уровню, в то время как у контрольных животных уровень глюкозы в крови в том же интервале времени достоверно не менялся.

Согласно изобретению инсулинсодержащее лекарственное средство может быть успешно использовано не только при лечении сахарного диабета, но также при других видах патологии, сопровождающихся гипергликемией (обширные хирургические раны, термические повреждения, септические состояния, геморрагический шок, анестезия и др.), а также при патологических состояниях, характеризующихся повышенным распадом белка и сниженным его синтезом (различные стадии ожоговой болезни, нефропатии и т.д.).

Лекарственное средство в процессе изготовления или в готовом виде может быть обработано желатином или каким либо другим инертным соединением, а перед употреблением суспензироваться в воде. Лекарственное средство может быть изготовлено в виде таблеток, защищенных каким либо инертным по отношению к нему соединением, а также применяться в виде суспензии, сохраняющейся при +4°C не менее 3 – х месяцев.

Таблица 1

Группы животных	Количество животных	Глюкоза в крови, мм/л		% снижения к контролю
		$M \pm m$	p	
Без лекарственного ср – ва (контроль)	20	16,10 $\pm$ 0,74		
Инсулинсодержащее лекарственное средство перорально:	20	5,62 $\pm$ 0,44	<0,01	65

Таблица 2

Группы животных	Количество животных	Глюкоза в крови мм/л		% снижения к норме
		среднее	пределы колебаний	
Без инсулинсодержащего лекарственного средства (норма, 100%)	10	14,20	13,80±4,22	57
Инсулинсодержащее лекарственное средство согласно изобретения	10	6,21	5,74±1,76	

Таблица 3

Группы животных	Количество животных	Глюкоза в крови, ммоль/л				
		Исходный	через 3 ч	% снижения	через 6ч	% снижения
Инсулинсодержащее лекарственное средство перорального применения	10	15,5±2,6	7,5±2,4 p<0,01	52	7,24±1,78 p<0,01	53
Контроль без инсулинсодержащего лекарственного средства	10	15,6±2,5	14,1±2,5 p>0,5	45	14,1±2,6 p>0,5	2,1

АКТИВНОСТЬ ИНСУЛИНСОДЕРЖАЩЕГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРОКОВ ХРАНЕНИЯ

Таблица 4

Длительность хранения в годах	Содержание глюкозы в крови** в мм/л		% снижения
	исходный	через 3 часа	
1	2	3	4



1	2	3	4
0,01	$15,5 \pm 1,0$	$6,2 \pm 0,5$	60
0,5	$14,8 \pm 0,9$	$5,6 \pm 0,4$	62
1	$16,1 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,6$	58
2	$15,0 \pm 0,9$	$6,1 \pm 0,5$	59
4	$16,5 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,7$	61
5	$14,9 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,6$	6,0

\*лиофильно высушенное

\*\*введение перорально средства крысам со стрептозотоциновым диабетом

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Инсулинсодержащее лекарственное средство для перорального применения, содержащее инсулин и вспомогательное вещество, отличающееся тем, что оно содержит инсулин иммобилизованный на эритроцитах свежей крови млекопитающих в присутствии сшивающего агента при соотношении, в масс%:

инсулин 5 – 10

эритроциты, выделенные

из свежей крови млекопитающих 100

и представляет собой лиофилизированную форму с содержанием 1250 – 2000Е инсулина на 1 г сухой массы.

2. Средство по п.1, отличающееся тем, что в качестве вспомогательного вещества оно содержит желатин.

3. Средство по любому из пп. 1 или 2, отличающееся тем, что содержание вспомогательного вещества составляет 1 – 2,5 масс%.

4. Средство по любому из пп. 1 – 3; отличающееся тем, что в качестве эритроцитов используют эритроциты, выделенные из свежей крови свиньи, или крупного рогатого скота, или лошади.

5. Средство по любому из пп. 1 – 3, отличающееся тем, что оно содержит эритроциты, выделенные из свежей крови человека.

6. Средство по любому из пп. 1 – 5, отличающееся тем, что в качестве сшивающего агента оно содержит глутаровый диальдегид.

7. Способ получения инсулинсодержащего лекарственного средства для перорального применения, включающий выделение эритроцитов, из свежей крови млекопитающих, их инкубацию с инсулином в присутствии сшивающего агента, отмывку иммобилизованного инсулина физиологическим раствором, добавление стабилизатора и лиофилизацию, отличающийся тем, что инкубацию эритроцитов с инсулином проводят при соотношении инсулин: эритроциты –  $5 - 10 : 100$  и при содержании сшивающего агента в конечной концентрации  $0,05 - 0,35\%$  при  $4 - 8^{\circ}\text{C}$  в течении  $4 - 6$  часов, при этом в процессе выделения эритроцитов на кровь воздействуют центробежными силами величиной  $350 -$

1100\*g в течении 15 – 30 минут, а при инкубации инсулина с эритроцитами производят маятниковое качание смеси с частотой 0,1 – 0,5 Гц, причем отмывку иммобилизованного инсулина осуществляют в несколько циклов, при воздействии в каждом цикле центробежных сил величиной 350 – 1100\*g в течении 0,5 – 10,0 минут.

8.Способ по п.7, отличающийся тем, что в качестве стабилизатора используют желатин.

9.Способ по п.8, отличающийся тем, что в качестве стабилизатора используют желатин в количестве 1 – 2,5 масс%.

10.Способ по любому из пп. 7 – 9, отличающийся тем, что в качестве эритроцитов используют эритроциты, выделенные из свежей крови свиньи, или крупного рогатого скота, или лошади.

11.Способ по любому из пп. 7 – 9, отличающийся тем, что оно содержит эритроциты выделенные из свежей крови человека.

12.Способ по любому из пп. 7 – 11, отличающийся тем, что в качестве сшивающего агента оно содержит глутаровый диальдегид.

#### ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

1.Cho Y.W., Flynn M., Lancet, 1989, # 30, p.1518 Saffran M., Kumar G.S..

2.Savarlar C., et al., A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs, Science, 1986, v.233, pp.1081-1084.

3.Ehud Ziv., Miriam Kidron, Itamar Raz et al., Oral administration of insulin of solid form to nonbiabetic and diabetic dogs. Journal of Pharmaceutical Science 1994, x.83, # 6 pp.792-794.

4.Kidron M., Krausz M., Raz I et al., The absorption of insulin: from the intestine in dogs, Nenside. Surfactants. Deterg. 19989, v.26, #5, pp. 352-354

5.Ru №2117488 C1, 20.08.98

6.Ru №2066551 C1, 20.09.96

7.Ru №2058788 C1, 20.04.96

## РЕФЕРАТ

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано для лечения сахарного диабета, а также при других видах патологии, сопровождающихся гипергликемией или характеризующихся повышенным распадом белка и сниженным его синтезом.

Сущность изобретения: инсулинсодержащее лекарственное средство для перорального применения и способ получения инсулинсодержащего лекарственного средства для перорального применения. Инсулинсодержащее лекарственное средство содержит инсулин, иммобилизованный на эритроцитах крови млекопитающих в присутствии сшивающего агента. Способ получения лекарственного средства, включает выделение эритроцитов из крови млекопитающих под воздействием центробежных сил. Инкубацию полученных эритроцитов с инсулином в присутствии сшивающего агента при маятниковом качании смеси. Последующую отмывку иммобилизованного инсулина физиологическим раствором в несколько циклов, при воздействии на суспензию в каждом цикле центробежными силами. К иммобилизованному инсулину затем добавляют стабилизатор и производят его лиофилизацию.